

Hladina metalothioneinu u primárních záchytů zhoubného nádoru v oblasti hlavy a krku.

Fabrik I.^{1,2}, Duša F.^{1,2}, Binková H.³, Horáková Z.³, Adam V.¹, Eckschlager T.⁴, Kizek R.¹

- 1) *Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně*
 - 2) *Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno*
 - 3) *Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno*
 - 4) *Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. Lékařská fakulta, Univerzity Karlovy v Praze, Praha 5*
- * *Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

Klíčová slova

Metalothionein, Nádory oblasti hlavy a krku, Elektrochemická analýza, Automatizovaná detekce, Biomarker

Úvod

Problematika predikce a včasné diagnózy nádorových onemocnění začíná být jedním z hlavních úkolů laboratorní medicíny. Tento trend je jasně zřetelný z rostoucího počtu odborných publikací věnujících se tomuto tématu (internetová databáze Web of science zatím eviduje více než 25 000 publikací na toto téma). Naše pozornost byla soustředěna na protein metalothionein, jehož spojitost s nádorovým onemocněním byla naznačena již v několika studiích (Ebadi and Iversen, 1994, Cherian, et al., 2003. Hladina MT, jakožto možného nádorového markeru, by mohla pomoci nejen v odhalení nádorového onemocnění, ale i v určení stádia nemoci, prognózy vývoje a dalších individuálních charakteristik onemocnění (Petrlova, et al., 2006, Zelena, et al., 2004). V kombinaci s analýzou dalších markerů by se mohl MT stát nástrojem predikce v onkologii.

Nádorová onemocnění hlavy a krku

Nádorovými onemocněními oblasti hlavy a krku ročně onemocní okolo 650 000 nových pacientů, to je asi 6 % celkového přírůstku nových nádorových onemocnění. Ve střední a východní Evropě se tento typ nádorového onemocnění začíná rychle rozšiřovat. Asi 98 % nemocných je věkem nad 40 let, nicméně tato hranice se začíná snižovat. Nejčastěji zastoupená lokalizace je ze 40% dutina ústní; následuje hrtan (larynx) s 25% a hltan (pharynx) s asi 15% ze všech lokalizací. Faktory přispívající ke vzniku

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

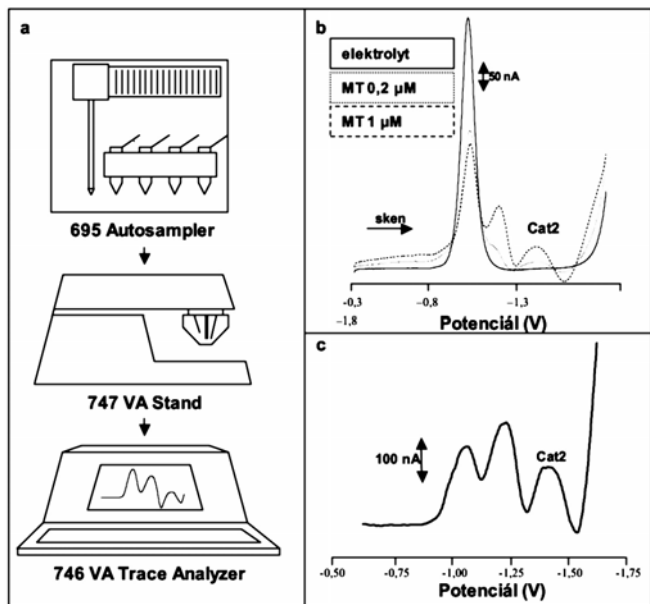
nádorového onemocnění hlavy a krku jsou především kouření a pití alkoholu, přičemž nejhorší je kombinace obojího (Dobrossy 2005). Léčba je založena především na včasném chirurgickém zákroku a radioterapii. Je-li nádor již v pokročilém stádiu a metastazoval, či je obtížně operovatelný, používá se chemoterapie, zejména se u těchto karcinomů osvědčilo použití léčiv na bázi platiny (cisplatinu, karboplatinu) někdy i v kombinaci s ozařováním (Argiris, et al., 2005).

Metalothionein

Jedná se o malý termostabilní protein s velikostí kolem 6-10 kDa, široce rozšířený v celé živočišné říši s vysokým stupněm homologie. Obsahuje větší množství cysteinu (až 30 % hmotnosti) a postrádá aromatické aminokyseliny. Díky sulfhydrylovým skupinám je schopen vytvářet s ionty kovů komplex; konkrétně jeho β doména dokáže navázat 3 dvojmocné ionty a α doména až 4 dvojmocné ionty (Kizek, et al. 2001). Celkově je MT schopen navázat až 12 jednomocných iontů. Ve fyziologickém stavu takto váže zinek či měď, nicméně při intoxikaci váže i těžké kovy (Cd, Pb, Hg aj.). Významná je i jeho antioxidační aktivita; spolu s dalším významným thiolem glutathionem vytváří redukční podmínky uvnitř buňky (Fabrik et al. 2007). Zatím nepříliš probádanou oblastí je role MT při regulaci exprese. MT se podílí také na vzniku resistance nádorových buněk vůči cytostatikům; nejlépe prozkoumané mechanismy jsou známy u cisplatinu (Kizek at al., 2004, Prusa, et al., 2006). MT je schopen komplex navázat, čímž zabrání kontaktu léku s DNA a tím snižuje účinnost léčby resp. zvyšuje zátěž pacienta. Detoxikace komplexu MT-cisPt poté probíhá zejména v ledvinách.

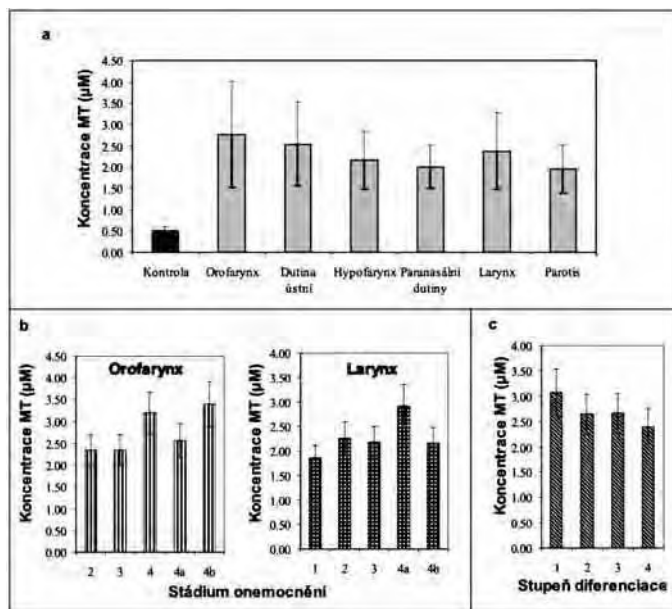
Materiál a metody

Vzorky byly analyzovány na přístroji 747 VA Stand ve spojení s 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko) (Obr. 1a) v klasickém třielektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol/l (Co(NH₃)₆)Cl₃ a 1 mol/l a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH 9,6) byl po každých pěti měřeních vyměněn. DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2 mV/s, modulační amplituda -250 mV, Eads = 0 V, teplota základního elektrolytu 4 °C. Vzorky krve pacientů s nádorem v oblasti hlavy a krku byly získány z Kliniky chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Vzorky byly připraveny následujícím způsobem; krev byla po čas 15-ti minut ponechána při 99 °C (Eppendorf 5430, USA), poté byly vzorky centrifugovány při 16 000 g, 4 °C po dobu 30 minut (Eppendorf 5402, USA). Následovalo odebrání supernatantu, který byl přímo analyzován.



Obr. 1

(a) Schéma zapojení automatického dávkovače 695 Autosampler do elektrochemického analyzátoru 747 VA Stand. Signály jsou transportovány do 746 VA Trace Analyzeru, kde jsou následně vyhodnoceny. (b) Voltamogramy elektrolytu a standardů MT a (c) voltamogram vzorku krve pacienta se zhoubným nádorem laryngu.



Obr. 2

Koncentrace metalothioneinu v závislosti na (a) lokalizaci nádoru, (b) stádiu onemocnění a (c) stupni diferenciacie nádorových buněk (orofarynx).

Výsledky a diskuse

Metallothionein jako marker zhoubných nádorů byl sledován u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku. Pro jeho detekci jsme zvolili v klinické praxi nezvyklé elektrochemické metody, které se vyznačují velkou sensitivitou a ekonomickou nenáročností (Petrlova, et al., 2006). Dále jsme kladli důraz na automatizaci detekce, abychom metodu co nejvíce přiblížili potřebám do běžné klinické praxe. Pro tento úkol jsme použili ve střední Evropě ojedinělé přístrojové sestavy, která právě toto umožňuje při malé potřebě biologického materiálu.

Výsledkem elektrochemické analýzy pomocí Brdičkovy reakce jsou proudové odpovědi. Mechanismus reakce je složitý a jeho povaha je zčásti katalytického původu. Poslední signál (Cat2) (Obr. 1b, 1c) je výsledkem redukce vodíkových iontů, který je přímo úměrný hladině metallothioneinu ve vzorku. Celkově bylo analyzováno 127 vzorků krve od pacientů s nádory v následující lokalizaci; orofarynx n = 64, dutina ústní n = 14, hypofarynx n = 13, paranasální dutiny n = 4, larynx n = 28 a parotis n = 4. Všechny vzorky pocházely z primárních záchytů a vždy se jednalo o zhoubné spinocelulární karcinomy. Výsledné koncentrace ukazují na zvýšenou hladinu MT u nemocných oproti kontrolní skupině. Největší koncentrace byla zaznamenána u zhoubného nádoru orofaryngu ($2,76 \pm 1,24 \mu\text{M}$), dále pak dutiny ústní ($2,54 \pm 0,98 \mu\text{M}$), laryngu ($2,38 \pm 0,90 \mu\text{M}$) a hypofaryngu ($2,16 \pm 0,68 \mu\text{M}$). Nejmenší pak u zhoubného nádoru paranasálních dutin ($2,01 \pm 0,51 \mu\text{M}$) a parotidy ($1,95 \pm 0,56 \mu\text{M}$). I to je ale asi 4x větší hladina než u kontrolní skupiny ($0,51 \pm 0,10 \mu\text{M}$, n = 58) (Obr. 2a). Dále byly sledovány odchylky ve vztahu ke stádiu nemoci (TNM klasifikace). Z výsledků vyplývá, že u některých lokalizací (orofarynx, larynx) odpovídá vyšší koncentrace pokročilejšímu stádiu nemoci (Obr. 2b). Pozornost jsme také zaměřili na závislost hladiny MT vzhledem ke stupni diferenciaci nádorových buněk (Obr. 2c). Nejméně diferencované zhoubné nádory (orofarynx) obsahují největší množství MT a se zvyšujícím se stupněm diferenciaci koncentrace MT klesá. To by mohlo být důsledkem intenzivního buněčného metabolismu dělících se buněk, které díky velké mitochondriální aktivitě produkují větší množství kyslíkových radikálů a potřebují zinek pro správnou funkci nově exprimovaných proteinů.

Závěry

Naše výsledky ukazují, že elektrochemické stanovení MT by po dalším prověření mohlo posloužit jako další vhodný marker u nádorů hlavy a krku eventuálně i u dalších maligních nádorů.

Literatura

1. ARGIRIS, A.; JAYARAM, P.; PICHARDO, D. Revisiting induction chemotherapy for head and neck cancer – References and reviews. *Oncology-New York*, 2005, roč. 19. č. 7, s. 932-945.
2. DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2005, roč. 24. č. 1, s. 9-17.
3. EBADI, M.; IVERSEN, P. L. Metallothionein in Carcinogenesis and Cancer-Chemotherapy. *General Pharmacology*, 1994, roč. 25. č. 7, s. 1297-1310.
4. FABRIK, I.; ADAM, V.; KRIZKOVA, S.; KUKACKA, J.; PRUSA, R.; TRNKOVA, L.; KIZEK, R. Level of heat-stable thiols in patients with a malignant tumor. *Klinicka onkologie*, 2007, roč. 20. č. 6, s. 384-389.
5. CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BAY, B. H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003, roč. 533. č. 1-2, s. 201-209.
6. KIZEK, R.; TRNKOVA, L.; PALECEK, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.*, 2001, roč. 73. č. 20, s. 4801-4807.
7. KIZEK, R.; VACEK, J.; ADAM, V.; VOJTESEK, B. Metallothionein – Cisplatin and anticancer therapy. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, roč. 12. č. 2, s. 72-78.
8. PETRLOVA, J.; BLASTIK, O.; PRUSA, R.; KUKACKA, J.; MIKLOVA, R.; STIBOROVA, M.; VOJTESEK, B.; ADAM, V.; ZITKAI, O.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Determination of metallothionein content in patients with breast cancer, colon cancer, and malignant melanoma. *Klinicka onkologie*, 2006, roč. 19. č. 2, s. 138-142.
9. PETRLOVA, J.; POTESIL, D.; MIKLOVA, R.; BLASTIK, O.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; JELEN, F.; PRUSA, R.; KUKACKA, J.; KIZEK, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta*, 2006, roč. 51. č. 24, s. 5112-5119.
10. PRUSA, R.; SVOBODA, M.; BLASTIK, O.; ADAM, V.; ZITKA, O.; BEKLOVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment. *Clinical Chemistry*, 2006, roč. 52. č. 6, s. A174-A175.
11. ZELENÁ, J.; POTESIL, D.; VACEK, J.; ADAM, V.; HRADECKY, J.; PRUSA, R.; KIZEK, R.; VOJTESEK, B. Metallothionein as a prognostic marker of tumor disease. *Klinicka onkologie*, 2004, roč. 17. č. 6, s. 190-195.

Poděkování

Práce byla podporována grantovým výzkumným projektem GA AV IAA401990701.